

## Leitthema

Orthopäde 2007 · 36:236–247  
 DOI 10.1007/s00132-007-1059-6  
 Online publiziert: 6. März 2007  
 © Springer Medizin Verlag 2007


H. Madry · A. Weimer · D. Kohn · M. Cucchiari  
 Labor für Experimentelle Orthopädie, Klinik für Orthopädie und  
 Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

# Tissue-Engineering zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer

## Aktuelle Forschungsergebnisse und Literaturübersicht

**Fokale Knorpeldefekte heilen nicht. Obwohl eine Vielzahl von operativen Maßnahmen, wie markraumeröffnende Verfahren [55, 61, 76] und die Transplantation von autologen kultivierten Chondrozyten ohne [6] oder mit einer unterstützenden Matrix [3] sowie von periostalen [57] und perichondralen Geweben [9] verfügbar sind, hat keine von ihnen zur Wiederherstellung des originalen hyalinen Gelenkknorpels geführt [43, 50]. Wegen dieser Unfähigkeit zur Regeneration besteht ein signifikantes klinisches Interesse an der Entwicklung von neuen Strategien zur Knorpelreparatur.**

Die Regenerationsfähigkeit von verletztem Gelenkknorpel ist trotz seiner bemerkenswerten Widerstandsfähigkeit begrenzt [8, 25, 70]. Wird der subchondrale Knochen penetriert, so füllt sich der Knorpeldefekt spontan mit einem Blutgerinnsel, welches mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark enthält. Nach einigen Wochen sind in diesem Gewebe Proteoglykane und Typ-I-Kollagen nachweisbar. Mit zunehmender Zeit resultiert ein neues Gewebe, welches reich an Typ-I-Kollagen und arm an Typ-II-Kollagen ist. Daher hat es minderwertigere strukturelle Eigenschaften als der originale hyaline Gelenkknorpel. Bereits nach einigen Monaten zeigen sich in diesem faserknor-

peligen Reparaturgewebe Anzeichen von Degeneration. Der Knorpeldefekt kann an Größe zunehmen und Ausgangspunkt einer arthrotischen Degeneration des Gelenks sein ([73];  Abb. 1).

### Gewebezüchtung

Die In-vitro-Züchtung von präformierten Geweben (Tissue-Engineering) ist ein innovativer Ansatz zur Erzeugung von Ersatzgeweben [41]. Hierbei wird eine Trägersubstanz (sog. „scaffold“) mit Zellen besiedelt und aus diesem Konstrukt ein funktionelles Ersatzgewebe gezüchtet. Dafür werden Zellen in einem geeigneten Differenzierungszustand oder -potenzial mit natürlichen oder synthetischen Biomaterialien kombiniert. Diesen Biomaterialien kommt eine dreifache Rolle zu: als dreidimensionales Gerüstwerk

- gewährleisten sie die korrekte räumliche Verteilung der Zellen,
- fördern die Gewebsbildung durch die Zellen und
- werden parallel zum Aufbau des neuen Gewebes abgebaut.

### Neoknorpel

Aus Chondrozyten kann durch Tissue-Engineering funktionales Knorpelgewebe geschaffen werden [41]. Während dieses Verfahrens heften sich isolierte Chondrozyten an polymere Trägersubstanzen an

und werden dann in Bioreaktoren kultiviert. Dieser Vorgang ist der embryonalen Chondrogenese ähnlich [19]. Während mehrerer Wochen proliferieren die Zellen innerhalb des Biomaterialgerüsts und deponieren eine extrazelluläre Matrix um sich herum. Das so neu gebildete Knorpelgewebe füllt schließlich die Hohlräume im Gerüstwerk vollkommen aus [86]. Parallel zur Matrixproduktion wird die Trägersubstanz abgebaut [19]. Nach mehreren Wochen entstehen knorpelige Konstrukte.

Der so gezüchtete Neoknorpel ist strukturell mit hyalinem Knorpel vergleichbar, hat jedoch eine geringere Belastbarkeit [85]. Werden diese präformierten Knorpelkonstrukte in osteochondrale Gelenkknorpeldefekte in vivo transplantiert, hat das Reparaturgewebe bessere strukturelle und funktionale Eigenschaften als mit zellfreien Trägersubstanzen behandelte Defekte [68]. Trotz dieser Fortschritte bleibt die Bereitstellung von regulatorischen Signalen für die Chondrogenese in optimalen zeitlichen und räumlichen Mustern eine Herausforderung [67].

### IGF-I

Wachstumsfaktoren sind chemische Boten, die eine wesentliche Rolle in der Regulation der Knorpelhomöostase spielen. Damit sind sie wichtige Werkzeuge zur

Verbesserung des Tissue-Engineering. Der insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I) [82], ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7600, steigert die Proliferation und Matrixsynthese von Chondrozyten [79]. Insbesondere stimuliert IGF-I die Synthese von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen. Aufgrund dieser Eigenschaften nimmt IGF-I eine Schlüsselstelle bei Ansätzen ein, die Chondrogenese im durch Tissue-Engineering hergestellten Knorpel zu verbessern. Die Anwendung von IGF-I als Protein zur Verbesserung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Neoknorpelkonstrukte wird jedoch durch seine kurze pharmakokinetische Halbwertszeit sehr erschwert [64].

### Gentransfer

Wie kann dieses Problem gelöst werden? Durch Gentransfer [12, 16] ist es möglich, potenziell therapeutische Gene in Chondrozyten überzuexprimieren [13, 14, 33, 35, 46, 90]. Zum Effekt des Transfers von Wachstumsfaktorgenen auf die Knorpelheilung lagen bereits ebenfalls Daten vor: Mason et al. transferierten erstmalig ein Wachstumsfaktorgen (BMP-7) in einen fokalen Defekt [53]. Die lokale Überexpression im Knorpeldefekt, die von transplantierten IGF-I überexprimierenden Zellen ausging, hatte auch zu einer verbesserten Knorpelreparatur geführt [24, 46]. Bislang wurden IGF-I und andere Gene jedoch über die Transplantation von isolierten periostalen [53] oder perichondralen Zellen [24, 58], Muskelzellen [1], Chondrozyten [33, 35, 46, 90] oder autologen Knochenmarkaspiraten [59] in einem Fibringerinnsel [24, 29], Alginat [35, 46], oder in einer Typ-I-Kollagen-Membran [90] im Defekt bereitgestellt.

Andere potenziell therapeutische Gene, die bislang untersucht wurden, sind „sonic hedgehog“ (Shh) [27], BMP-2 und IGF-I [24], „cartilage-derived morphogenetic protein 1“ (CDMP1) [34] und BMP-4 [40]. Die Zellen sind hierbei durch adenovirale [2], retrovirale [30, 33] und nichtvirale Vektoren [44, 81] modifizierbar. Hervorzuheben ist die bislang einzige Studie in einem Großtiermodell (Pferd) von Hida et al., die allerdings nach Überexpression von BMP-7 keine strukturellen Unterschiede in der Reparatur ergab [29].

Orthopäde 2007 · 36:236–247 DOI 10.1007/s00132-007-1059-6  
© Springer Medizin Verlag 2007

H. Madry · A. Weimer · D. Kohn · M. Cucchiari

### Tissue-Engineering zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer. Aktuelle Forschungsergebnisse und Literaturübersicht

#### Zusammenfassung

Tissue-Engineering ist die Züchtung von präformierten Geweben aus dreidimensionalen Zellverbänden. Werden Chondrozyten mit Trägersubstanzen assoziiert und im Bioreaktor kultiviert, so entwickelt sich Knorpelgewebe. Wir wollten verstehen, wie der humane insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I) die Chondrogenese in diesen Neoknorpelkonstrukten reguliert. Hierzu wurden IGF-I-transfizierte Chondrozyten in Geweben aus Polyglykolsäurefasern ausgesät und in rotierenden Bioreaktoren kultiviert. Die Transgenexpression nach lipidbasiertem Gentransfer hielt mehr als 5 Wochen im Neoknorpel an. Nach 4-wöchiger Kultivierung in rotierenden Bioreaktoren besitzen die IGF-I-Konstrukte deutlich mehr Chondrozyten und Proteogly-

kane als Kontrollkonstrukte aus nichtmodifizierten oder mit dem Markergen *lacZ* modifizierten Konstrukten. Diese strukturellen Verbesserungen resultierten in signifikant verbesserten biomechanischen Eigenschaften der IGF-I-Konstrukte. Transplantation dieser Neoknorpelkonstrukte in osteochondrale Defekte im Kaninchenmodell verbesserte die strukturellen Eigenschaften des Reparaturgewebes im Vergleich zu *lacZ*-Konstrukten. Diese Studien belegen erstmals die Möglichkeit einer auf der Kombination von Gentransfer und Tissue-Engineering basierenden molekularen Therapie von Knorpeldefekten.

#### Schlüsselwörter

Tissue-Engineering · Gentransfer · Knorpeldefekte · IGF-I · Transplantation

### Tissue engineering for articular cartilage repair improved by gene transfer. Current concepts

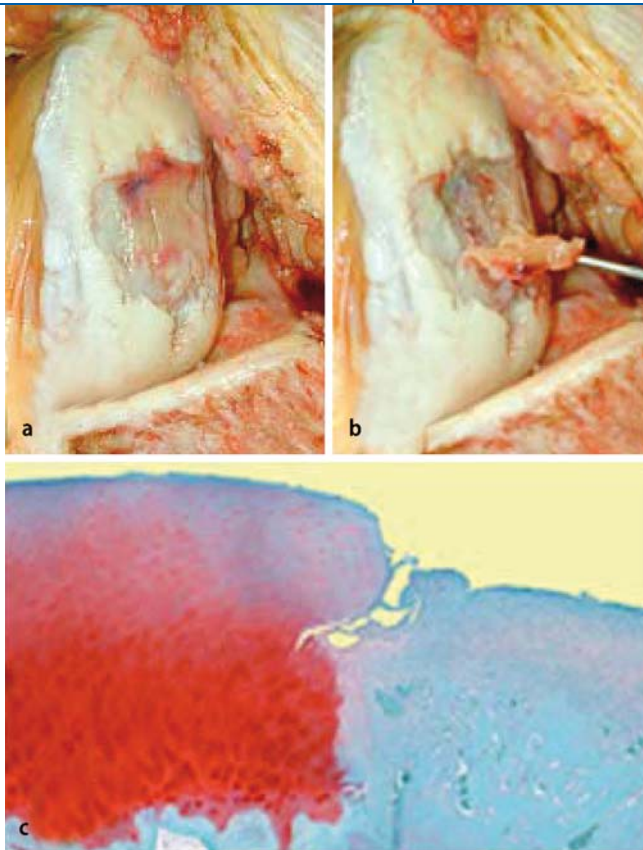
#### Abstract

Cartilage tissue engineering is the creation of functional substitutes of native articular cartilage in bioreactors by attaching chondrogenic cells to polymer scaffolds. One limitation of tissue engineering is the delivery of regulatory signals to cells according to specific temporal and spatial patterns. Using gene transfer techniques, polypeptide growth factor genes such as the human insulin-like growth factor I (IGF-I) gene can be transferred into chondrocytes. When these modified cells are used for cartilage tissue engineering, the

resulting cartilaginous constructs have improved structural and functional characteristics compared to constructs based on non-modified cells. The combination of cartilage tissue engineering with overexpression of potential therapeutic genes using gene transfer technologies provides a basis for the development of novel molecular therapies for the repair of cartilage defects.

#### Keywords

Tissue engineering · Gene transfer · Cartilage defects · IGF-I · Transplantation



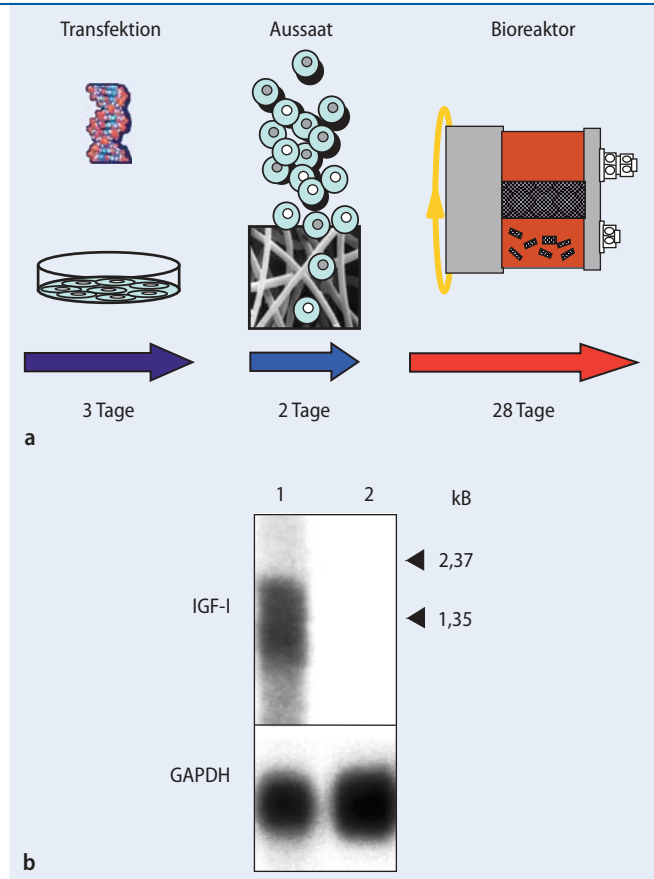
**Abb. 1** ▲ Das Problem der Knorpelreparatur. Nach Behandlung eines osteochondralen Defekts der Femurkondyle mit einem markraumeröffnenden Verfahren hat sich auf Basis eines Blutgerinnsels ein Reparaturgewebe gebildet. Dieses Gewebe hat zwar makroskopisch ein ähnliches Aussehen wie der benachbarte Gelenkknorpel (a), es lässt sich jedoch leicht mit einem Tasthaken ablösen (b). Das histologische Bild (c) der Safranin-O-Echtgrünfärbung zeigt ein faserknorpeliges Gewebe (rechts in c), welches an den normalen Gelenkknorpel (links in c) angrenzt. Das Regeneratgewebe entspricht in seiner Qualität nicht dem ursprünglichen hyalinen Knorpel

Wieder eine andere Strategie beruht auf dem alleinigen Transfer von therapeutischen Genen ohne simultane Zelltransplantation [12, 13, 14, 44, 83, 84]. Hierbei finden rekombinante adenoassoziierte virale Vektoren (rAAV) Anwendung, da sie effizient die knorpelige Matrix, die die Chondrozyten umgibt, penetrieren können. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass der direkte Gentransfer des Fibroblastenwachstumsfaktors 2 (FGF-2) durch rAAV zur Verbesserung der Knorpelreparatur führt [13]. Eine andere Möglichkeit wäre das Einbringen von Biomaterialien, an welche Genvektoren (ohne Zellen) assoziiert sind, in den Gelenkknorpeldefekt. Obwohl dieser Ansatz experimentell zur Reparatur von Knochendefekten führte [5, 23], liegen zur Knorpeldefektheilung bislang keine Daten vor.

## Eigener Ansatz

### Strategie

Wir haben einen neuen, bislang noch nicht beschriebenen Ansatz zur Knorpelregeneration vorgeschlagen. Er besteht aus dem Transfer von regulierenden Gensequenzen in die Chondrozyten, die sich der Chondrogenese unterziehen und diese Neoknorpelkonstrukte bilden. Mit dieser Verbindung zwischen Tissue-Engineering und Genthherapie könnte eine Grundlage zur kontrollierten Gewebsentwicklung geschaffen werden, die zur verbesserten Reparatur von Knorpeldefekten anwendbar ist. Die Bildung des Wachstumsfaktors durch Chondrozyten soll dabei zu hohen lokalen Konzentrationen im durch Tissue-Engineering hergestellten

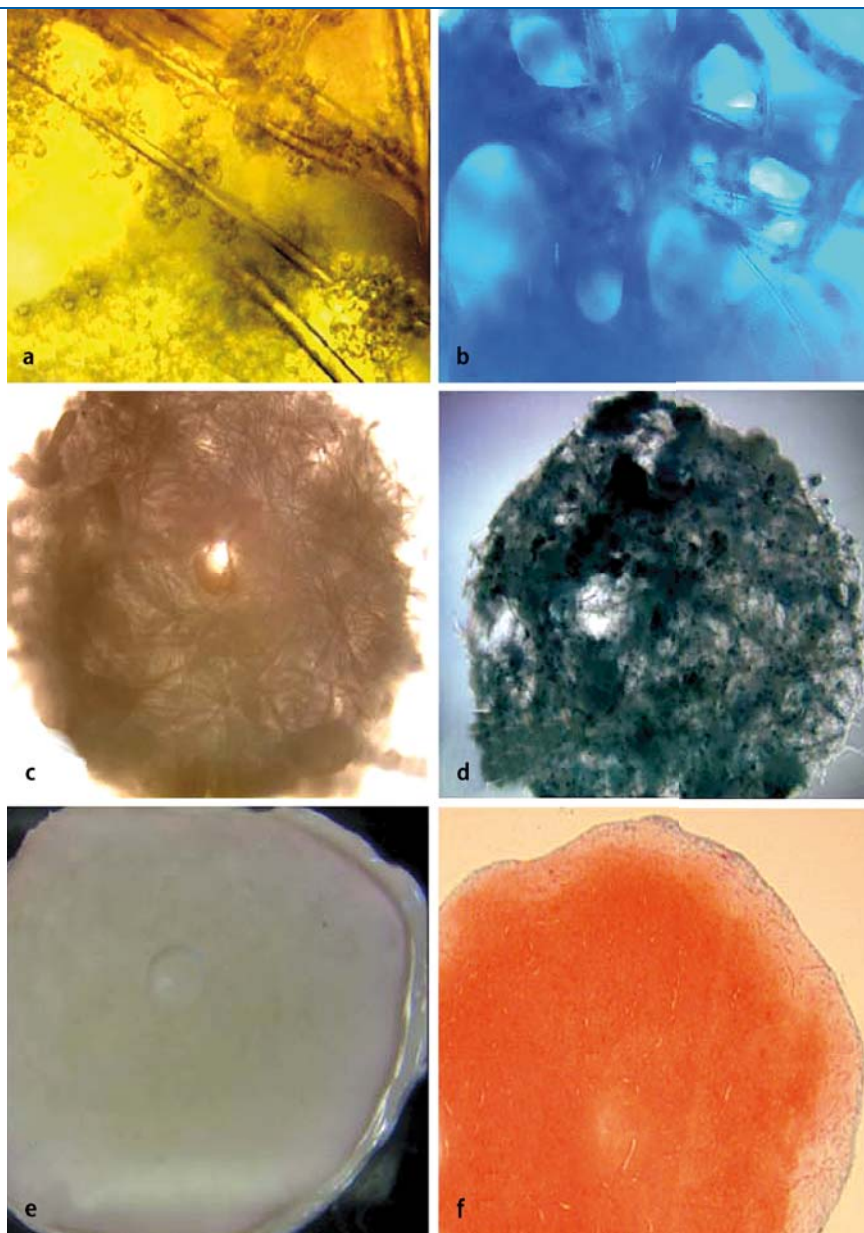


**Abb. 2** ▲ Experimentelle Strategie. (a) Monolayerkultur, dreidimensionale Gerüststrukturen, Bioreaktor mit Membranoxygenierer in seiner Mitte. (b) Expression von humanem IGF-I in transfizierten Chondrozyten. Das Autoradiogramm zeigt einen Northern-Blot von tRNS aus Chondrozyten, die mit dem IGF-I-Vektor pCMVhIGF-I (1) oder mit dem LacZ-Expressionsvektor (2) transfiziert wurden. Die Hybridisierung der RNS mit einer hIGF-I-cDNS-Sonde erzeugt eine Bande von ~1,3 Kilobasen (kB) in 1, welche aus der hIGF-I RNS (760 Basenpaare) und dem Poly[A<sup>+</sup>]-Schwanz besteht. Die transferierte humane IGF-I-cDNS wird von den Chondrozyten exprimiert. Aus [47]

Knorpelkonstrukt führen (■ Abb. 2a). Nach Transplantation in Knorpeldefekte sollen sowohl die Knorpelzellen im Konstrukt als auch die aus dem Knochenmark aufsteigenden pluripotenten Zellen zur Chondrogenese angeregt werden.

Diese Überexpression von therapeutischen Genen in durch Tissue-Engineering hergestellten Knorpelkonstrukten bietet im Vergleich zu den genannten Strategien den wichtigen Vorteil einer kompletten Defektausfüllung mit einem präformierten Knorpelkonstrukt, welches gleichzeitig in der Lage ist, chondrogen wirkende Gene räumlich definiert bereitzustellen. Durch diesen Ansatz würde der Knorpeldefekt unmittelbar mit einem Gewebe gefüllt werden, welches bereits initial eine bessere mechanische Stabilität aufweist als zum Beispiel das Blutgerinn-





**Abb. 3** ▲ Tissue-Engineering von gentherapeutisch verbessertem Knorpel. **a** Anheften von transfizierten Chondrozyten an Gerüstwerke aus Polyglykolsäurefasern (Vergr. 200:1). **b** X-gal-gefärbtes *lacZ*-Konstrukt (Vergr. 100:1). **c** Mit Chondrozyten ausgesätes Konstrukt (Vergr. 10:1). **d** *LacZ*-Konstrukt (Vergr. 10:1). **e** Neoknorpelkonstrukt (Vergr. 20:1). **f** Histologischer Schnitt durch ein Konstrukt (Safranin-O-Färbung, Vergr. 20:1). Erläuterung s. Text

sel, welches durch markraumeröffnende Verfahren entsteht. Eine solche Strategie könnte klinisch eine frühzeitige postoperative Funktion unter physiologischen Belastungszuständen erlauben.

## Vorgehen

Bei unserer experimentellen Strategie gehen wir folgendermaßen vor: Chondrozyten werden aus Gelenknorpel isoliert und in Monolayerkultur mit Expressions-

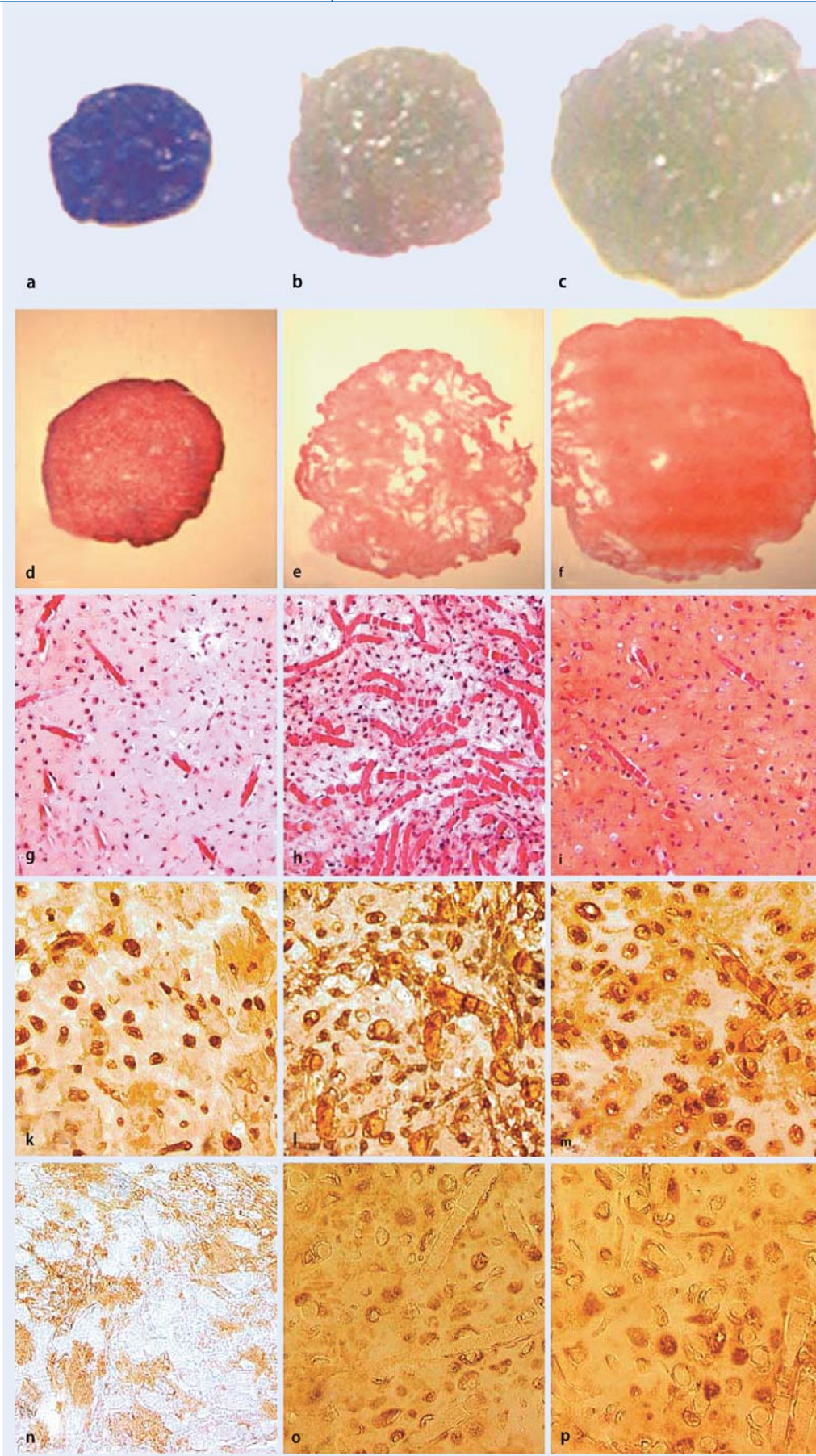
vektoren für Wachstumsfaktoren transfiziert. Nach 3-tägiger Kultivierung werden die von der Kulturschale abgelösten Zellen dynamisch in dreidimensionale Gerüststrukturen aus Polyglykolsäurefasern ausgesät. Zwei Tage später werden diese Konstrukte in Bioreaktoren überführt und für 4 weitere Wochen kultiviert. Der Bioreaktor besitzt einen Membranoxygenierer, über den die  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Partialdrücke regulierbar sind. Die durch die Rotation um seine eigene Achse erzeugte lami-

nare Strömung ist Voraussetzung für eine optimale Chondrogenese. Zwischen den auf die Konstrukte einwirkenden Kräften herrscht ein Gleichgewicht: die Neoknorpelkonstrukte schweben frei im Medium.

In **Abb. 3** ist das Tissue-Engineering von gentherapeutisch verbessertem Knorpel dargestellt. Transfizierte Chondrozyten heften sich an Gerüstwerke aus Polyglykolsäurefasern an (**Abb. 3a**). Nach 2 Tagen Aussaat sind etwa 95% der Zellen weintraubenartig an die Biomaterialfasern angeheftet. In der Abbildung sind noch große Zwischenräume zwischen den Zellansammlungen erkennbar. Im Verlauf der anschließenden Kultivierung im Bioreaktor werden diese Zwischenräume vollständig mit Zellen und extrazellulärer Matrix ausgefüllt. Die Blaufärbung des X-gal-gefärbten *lacZ*-Konstrukts in **Abb. 3b** eine Woche nach Bioreaktorkultivierung zeigt eine positive Transgenexpression an. Die Zellverbände sind deutlich größer geworden, die Zwischenräume zwischen den Verbänden kleiner. **Abb. 3c** zeigt ein mit Chondrozyten ausgesätes Konstrukt 3 Tage nach dynamischer Aussaat vor dem Transfer in den Bioreaktor; **Abb. 3d** ein *LacZ*-Konstrukt nach der Aussaat vor dem Transfer in den Bioreaktor. Bei dem Neoknorpelkonstrukt aus IGF-I-transfizierten Chondrozyten nach 4-wöchiger Kultivierung im Bioreaktor (**Abb. 3e**) sind die Zwischenräume zwischen den fast aufgelösten Fasern des Biomaterials vollkommen mit chondroider Matrix aufgefüllt. Einen histologischen Schnitt durch ein Konstrukt, welches für 4 Wochen im Bioreaktor und 10 weitere Tage s.c. in der Nacktmaus implantiert wurde, stellt **Abb. 3f** dar.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften wählten wir IGF-I als Kandidatengen für diese Studien aus. Um zu verstehen, wie IGF-I die Chondrogenese in durch Tissue-Engineering hergestelltem Neoknorpel reguliert, testeten wir zunächst die Hypothese, dass die Überexpression von humanem IGF-I durch Chondrozyten zu einer dauerhaften Transgenexpression in gezüchteten Knorpelkonstrukten in vitro und in vivo führt. Wir überprüften weiterhin die Hypothese, dass überexprimiertes IGF-I die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser knorpeligen Konstrukte verbessert.





**Abb. 4** ◀ Makroskopisches Bild (a–c), histologische (d–i) und immunhistochemische (k–p) Analyse von Neoknorpelkonstrukten aus normalen (mittlere Reihe; b, e, h, l, o) und transfizierten Chondrozyten. Isolierte Knorpelzellen wurden mit Vektoren für *lacZ* (linke Reihe; a, d, g, k, n), sowie humanes IGF-I (rechte Reihe; c, f, i, m, p) transfiziert, in Gerüstwerke aus Polyglykolsäurefasern eingesät und 4 Wochen in Bioreaktoren kultiviert. Makroskopisches Bild von durch Tissue-Engineering erzeugten Knorpelkonstrukten aus *lacZ*- (a), nichtmodifizierten (b), sowie IGF-I-modifizierten (c) Chondrozyten. Safranin-O-Färbung, d–i Vergr. 20:1, g–i Vergr. 200:1. Die Reste des Biomaterials sind als strichförmige Strukturen noch erkennbar. Repräsentative histologische Schnitte, gefärbt mit Antikörpern gegen Typ-II-Kollagen (k–m) und Aggrecan (n–p); Vergr 200:1

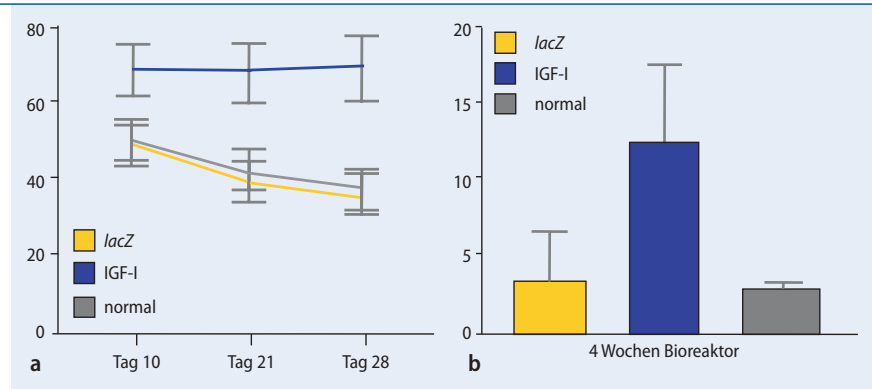
Als ersten Schritt identifizierten und optimierten wir eine effiziente Technik zum Gentransfer in Chondrozyten.

## Transfektion

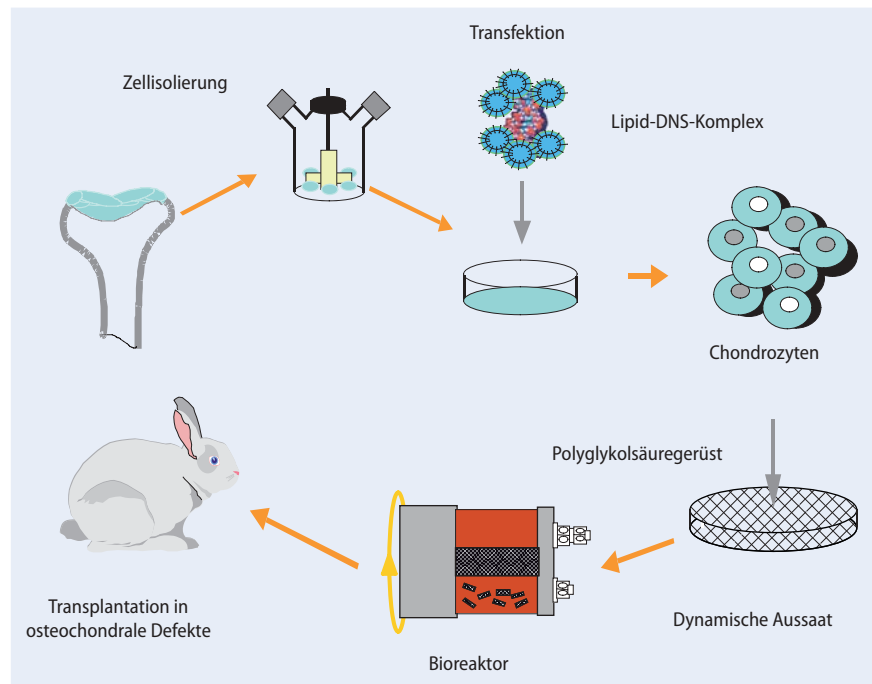
Während die Transfektion von embryonalen Vogel- [42] oder juvenilen Säugerchondrozyten [26] bereits beschrieben wurde, war bislang das nichtvirale Einschleusen von fremdem genetischem Material in adulte Chondrozyten relativ erfolglos. Insbesondere lagen keine Daten zum nichtviralen Gentransfer in humane normale oder arthrotische Chondrozyten vor. In den Studien zu Vogel- oder Säugerchondrozyten erwies sich das lipidbasierte System FuGENE6 verbunden mit einer Hyaluronidasebehandlung vor und während der Transfektion als optimal [48]. Unter optimierten Bedingungen lag die Gentransfereffizienz bei 41% in bovinen Chondrozyten, bei 21% in normalen humanen Chondrozyten und bei 8% in arthrotischen humanen Chondrozyten. Diese Ergebnisse zeigen, dass nichtvirale, lipidbasierte Methoden hinreichend optimiert werden können, um Gene in humane adulte und andere Chondrozyten zu transferieren [48]. FuGENE6 zeichnet sich im Vergleich mit adenoviralen Vektoren durch fehlende Immunogenität bei einer hohen Transfektionseffizienz aus [15].

Anschließend konstruierten wir einen IGF-I-Expressionsvektor. Hierzu wurde eine humane IGF-I-cDNS unter Kontrolle des Zytomegalievirus-immediate-early- (CMV-IE-)Promotors gestellt und in den kommerziell erhältlichen Vektor pcDNA3.1Zeo(+) einkloniert. Die Testung dieses IGF-I-Expressionsvektors pCMVhIGF-I erfolgte durch den Nachweis der mRNA des Transgens im „Northern blot“ (■ **Abb. 2b**) und des biologisch aktiven humanen IGF-I-Proteins per ELISA ( $83 \text{ ng}/1 \times 10^7 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ ) und seiner proliferativen Wirkung auf Monolayerkulturen von bovinen Chondrozyten [49].

Für Studien zum Tissue-Engineering verwendeten wir dreidimensionale Gerüststrukturen aus Polyglykolsäure, da sie eine kontrollierte Chondrogenese in vitro ermöglichen [19, 20]. Wir transfizierten bovine Chondrozyten mit dem IGF-I-Expressionsvektor pCMVhIGF-



**Abb. 5** ▲ Entwicklung der Nassmasse von Neoknorpelkonstrukten im Zeitverlauf (a). Biomechanische Eigenschaften der Neoknorpelkonstrukte (b). Erläuterung s. Text



**Abb. 6** ▲ Prinzip der In-vivo-Experimente. Nach Isolierung von Chondrozyten und deren Transfektion wurden die von der Zellkulturschale abgelösten Chondrozyten dynamisch in Trägersubstanzen aus Polyglykolsäurefasern ausgesät. Nach 28-tägiger Kultivierung in rotierenden Bioreaktoren fand die Transplantation in osteochondrale Defekte in der Trochlea femoris im Kniegelenk von Chinchilla-Bastard-Kaninchen statt. Nach 28 Wochen wurden die Kondylen entnommen und analysiert

I oder mit dem Markergen  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ*) von *Escherichia coli* (*E. coli*) [49] durch FuGENE6. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen in Polyglykolsäure-Gerüsten dynamisch ausgesät (■ **Abb. 3a**; [86]). Anschließend wurden die Konstrukte auf rotierende Bioreaktoren verteilt.

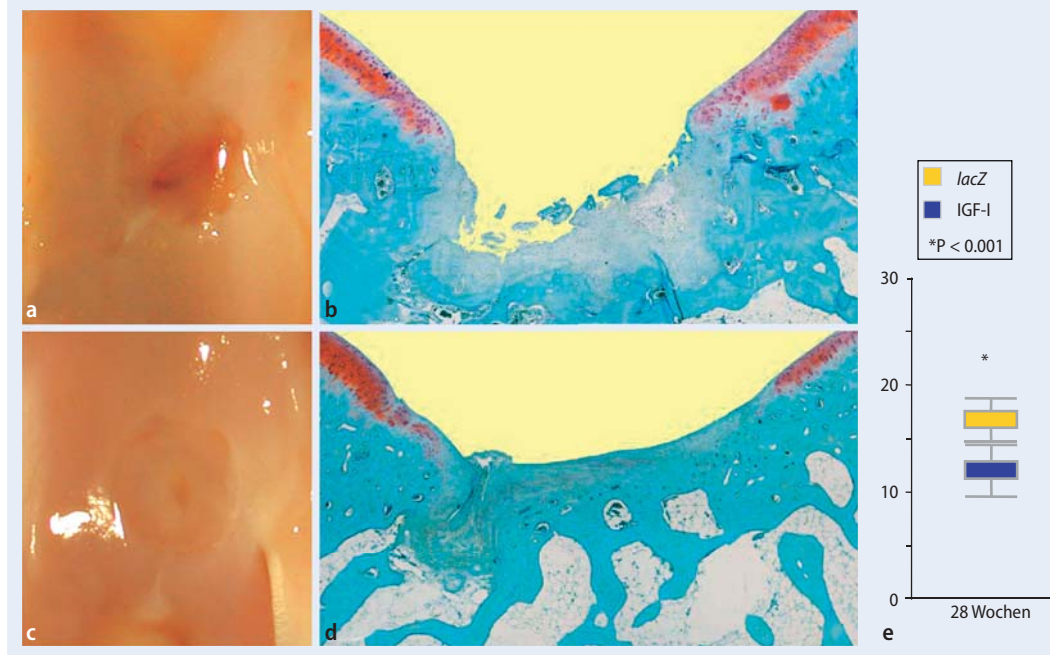
## Kultivierung

Die Überlegenheit der Bioreaktorkultivierung hatten wir zuvor im Vergleich mit der Kultivierung der Konstrukte in statischen und in horizontal durchmischten

Zellkulturschalen bestätigt. In diesen Experimenten zeigte sich, dass in den statischen Kulturen die Geschwindigkeit der Degradation des Biomaterials deutlich schneller war als der Gewebsaufbau – nach 2 Wochen zerfielen die statisch kultivierten Konstrukte. Im Vergleich der horizontal durchmischten Kulturen mit den Bioreaktorkulturen kam es nur im Bioreaktor zu einer hinreichenden Gewebsbildung.

Nach 4 Wochen Kultivierung in rotierenden Bioreaktoren (■ **Abb. 3b–f**) sind die Knorpelkonstrukte, welche die hu-





**Abb. 7** Verbesserung der Knorpelreparatur durch Transplantation von IGF-I-Konstrukten. Makroskopisches (a, c) und histologisches (b, d, Safranin-O-Echtgrün, Vergr. 100:1) Bild nach Transplantation von durch Tissue-Engineering hergestellten gentherapeutisch modifizierten Konstrukten. Auswertung (e). Erläuterung s. Text. (Adaptiert aus [11])

mane IGF-I-cDNS tragen (nachfolgend als IGF-I-Konstrukte bezeichnet), deutlich schwerer und haben eine größere Oberfläche als Konstrukte aus nichtmodifizierten oder mit dem *lacZ*-Gen modifizierten Chondrozyten (nachfolgend als *lacZ*-Konstrukte bezeichnet). Die Struktur der IGF-I-Konstrukte ist hinsichtlich Zellhomogenität, Zellreichtum, Intensität der Safranin-O-Färbung und der biochemischen Zusammensetzung sowie ihrer Masse zu jedem Zeitpunkt den Kontrollkonstrukten überlegen (■ **Abb. 4, 5a**). Die Nassmasse der Konstrukte aus IGF-I-transfizierten Chondrozyten blieb konstant, während die Nassmasse von Konstrukten aus normalen oder *lacZ*-transfizierten Chondrozyten im Zeitverlauf der Bioreaktorkultivierung abnahm (■ **Abb. 5a**). Biomechanische Untersuchungen der IGF-I-Konstrukte nach 4-wöchiger Kultivierung ergaben ein signifikant erhöhtes Steifigkeitsmodul in Kompression (Equilibrium-Modulus) im Vergleich mit Kontrollkonstrukten (■ **Abb. 5b**). Die Verbesserung war dabei im Vergleich mit normalen und *lacZ*-modifizierten Konstrukten festgestellt worden ( $p < 0,03$ ).

### Genexpression

In vivo bleibt nach subkutaner Transplantation des Neoknorpels in Nacktmäusen die Genexpression bis zum Ende des Experiments erhalten (38 Tage nach Trans-

fektion). Diese Daten beweisen, dass die Überexpression von humanem IGF-I die In-vitro-Chondrogenese im Neoknorpelkonstrukt moduliert. Als Resultat sind strukturelle und funktionelle Parameter verbessert. Diese Intensivierung der Chondrogenese durch räumlich definierte Überexpression von IGF-I lässt vermuten, dass in vitro gezüchtete knorpelige Konstrukte, die auf genetisch modifizierten Chondrozyten basieren, vorteilhafter als alleiniger Gentransfer oder Tissue-Engineering sind [47]. Dieses Konzept stellt ein physiologisch relevantes Modellsystem zur Verfügung, welches zum kontrollierten Studium des Einflusses anderer Faktoren und Mechanismen auf die Chondrogenese verwendet werden kann.

### Gewebsaufbau

Es blieb jedoch ungeklärt, ob derartige durch Tissue-Engineering gezüchtete Knorpelkonstrukte, die auf Chondrozyten basieren, welche den Wachstumsfaktor IGF-I überexprimieren, die Reparatur von osteochondralen Knorpeldefekten in vivo verbessern. Hierzu wurden *lacZ*- und IGF-I-Konstrukte aus Chondrozyten von Kaninchen hergestellt. Einen Tag nach der Transfektion wurden die modifizierten Chondrozyten dynamisch in ein Gerüstwerk aus Polyglykolsäurefasern ausgesät (■ **Abb. 6**). Zum Zeitpunkt des Transfers in die Bioreaktoren gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich

der Nassmasse zwischen *lacZ*- und IGF-I-Konstrukten. Die durchschnittliche Nassmasse der Konstrukte beider Gruppen verminderte sich während der Kultivierung im Bioreaktor. Nach 28 Tagen der Bioreaktorkultivierung waren die IGF-I-Konstrukte bereits 1,8-fach schwerer als *lacZ*-Konstrukte. Das entspricht einer Abnahme der Nassmasse für *lacZ*-Konstrukte um 76% und für IGF-I-Konstrukte um 59% am Tag 28 im Vergleich zu Tag 0.

Damit ist im Vergleich zu *lacZ*-Konstrukten der Gewebsaufbau in IGF-I-Konstrukten auf eine höhere biosynthetische Aktivität der Chondrozyten als Folge des Gentransfers zurückzuführen. Die Geschwindigkeit des Abbaus des Biomaterials ist höher als die Gewichtszunahme beider Gruppen. Um die IGF-I-Produktion der Konstrukte zu ermitteln, wurden Konstrukte jeder Gruppe individuell kultiviert und das konditionierte Medium nach Extraktion von Bindungsproteinen mittels eines IGF-I-ELISA analysiert. Zu allen getesteten Zeitpunkten lag die IGF-I-Konzentration von *lacZ*-Konstrukten unterhalb der Nachweisgrenze. IGF-I-Konstrukte produzierten  $2,2 \pm 0,3$  ng IGF-I pro Konstrukt/24 h am Tag 3 nach der Transfektion. Im Vergleich lag die durchschnittliche IGF-I-Produktion der Chondrozyten, die mit pCMVhIGF-I transfiziert und in Monolayern kultiviert wurden, bei  $289 \pm 41$  ng/ $1 \times 10^7$  Zellen/24 h am Tag 3 nach Transfektion. Dieses Ergeb-

nis stimmt mit publizierten Daten überein [7, 75].

### Transgenexpression

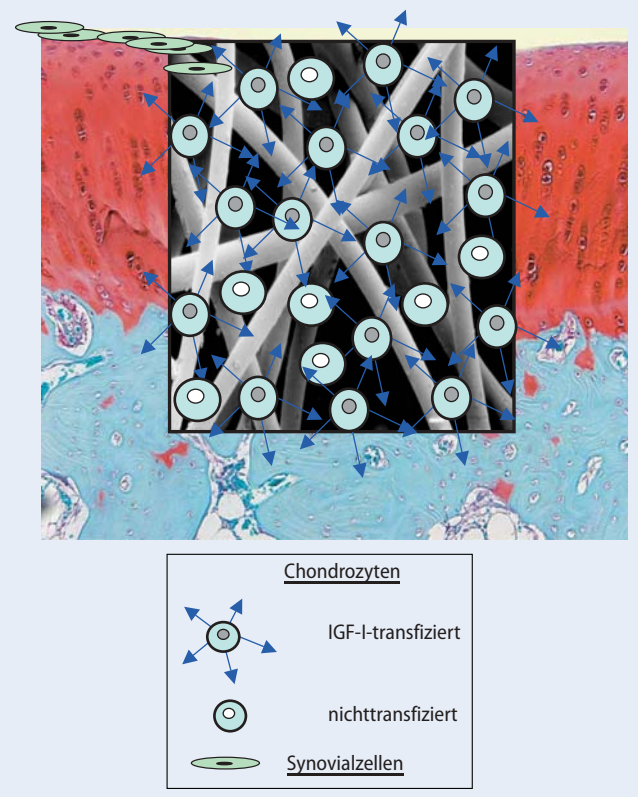
Unterschiede in der Höhe der Transgenexpression zwischen den einzelnen Kultivierungsformen könnten aus unterschiedlichen Zellzahlen, dem verschiedenartigen Versuchsaufbau, anderen synthetischen Fähigkeiten von Chondrozyten verschiedener Spezies sowie aufgrund der Interaktionen im neu gebildeten Reparaturgewebe von IGF-I mit den IGF-I-Bindungsproteinen [22] und IGF-I-Rezeptoren an den Chondrozyten, die das Transgen tragen, und von benachbarten, nichttransfizierten Chondrozyten begründet sein.

Die Implantation von *lacZ*- oder IGF-I-Konstrukten wurde nach 28 Tagen Bioreaktorkultivierung durchgeführt. In jeder über einen medialen parapatellaren Zugang exponierten Trochlea femoris des Kniegelenks wurde ein zylindrischer osteochondraler Defekt mit einem manuell betriebenen kanülierten Bohrer (3,2 mm Durchmesser) gesetzt und *lacZ*- oder IGF-I-Konstrukte in die Defekte eingepasst. Bei dieser Defektgröße findet keine komplette spontane Knorpelreparatur statt [4, 13, 21, 31, 32, 35, 46, 71, 72, 73]. Die Tiere befanden sich im Stadium der Fusion der Wachstumsfugen [37], die 1–2 Monate nach der Operation abgeschlossen war [36].

Um eine klinische Situation unter Vollbelastung zu simulieren, wurde den Kaninchen eine uneingeschränkte Aktivität unter voller physiologischer Belastung unmittelbar nach der Operation erlaubt. Nach 28 Wochen wurden die distalen Femora analysiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um die Langzeiteffekte auf die Gelenkknorpelreparatur in erwachsenen Tieren zu evaluieren: Das Reparaturgewebe degeneriert bereits nach 12 Wochen in derartigen Defekten [73, 87]. Makroskopisch fand sich kein Gelenkerguss, keine Osteophyten oder Adhäsionen. Die Ränder der Defekte waren immer erkennbar, das Reparaturgewebe hatte eine rötlich-weiße Farbe (Abb. 7).

Interessanterweise waren 28 Wochen nach Transplantation die IGF-I-Spiegel in der Gelenklavage nicht erhöht. Dieser Befund kann auf der Interaktion des IGF-I mit IGF-I-Bindungsproteinen im neu-

**Abb. 8** ▶ Prinzip der Reparaturvorgänge nach Transplantation von genetisch modifizierten, durch Tissue-Engineering hergestelltem Neoknorpel. Erläuterung s. Text



en Gewebe beruhen oder auf den Verlust des Transgens zurückgehen. Selbst wenn 25.000 ng IGF-I-Protein als Gemisch von polymerisiertem Fibrin mit Chondrozyten in osteochondrale Defekten appliziert wurden, konnte keine signifikante Erhöhung des IGF-I-Spiegels in der Synovialflüssigkeit 4 Tage nach Applikation gefunden werden [17]. Das ist eine 50.000-fach höhere Dosis als die 0,5 ng, die pro Konstrukt in der vorliegenden Studie am Tag 14 sezerniert wurden. Dieses Fehlen von erhöhten intraartikulären IGF-I-Spiegeln ist in einem klinischen Rahmen wünschenswert, um systemische Effekte zu vermeiden.

### Reparaturqualität

In Abb. 7 ist das makroskopische (Abb. 7a, c) und histologische (Abb. 7b, d) Bild der Knorpelreparatur nach Transplantation von durch Tissue-Engineering hergestellten gentherapeutisch modifizierten Konstrukten dargestellt. Bei beiden Gruppen sind die Defekte makroskopisch noch gut erkennbar (Abb. 7a, c). Nach Transplantation von *lacZ*-Konstrukten (Abb. 7a, b) zeigt sich im histologischen Bild eine insuffiziente Reparatur mit inkompletter Fül-

lung des Defektes. Nach Transplantation von IGF-I-Konstrukten ist die Knorpelreparatur im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verbessert (Abb. 7c, d). Eine komplette Knorpelregeneration trat nicht auf. Die Auswertung erfolgte mittels eines Bewertungssystems der Knorpelreparatur (Abb. 7e). Hierbei erhält ein komplett regenerierter Defekt die Punktzahl 0, ein leerer Defekt die Punktzahl 31. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen lagen vor.

Wie können Unterschiede in der strukturellen Reparaturqualität der osteochondralen Defekte erkannt und quantifiziert werden? Hierzu verwendeten wir das von Sellers et al. [71, 72] beschriebene histologische Bewertungssystem. Dieses System basiert auf 8 individuellen Parametern wie Vollständigkeit der Defektaufüllung, Integration des neuen Knorpels, Intensität der Safranin-O-Färbung sowie Zellmorphologie und Zellarchitektur innerhalb des Reparaturgewebes, Beschaffenheit seiner Oberfläche sowie das Ausmaß der Wiederherstellung des subchondralen Knochens und der „tidemark“. Die addierten Einzelpunkte ergeben eine durchschnittliche Gesamtbewertung. Dabei entspricht der maximale Wert



von 31 Punkten einem leeren Defekt ohne Reparaturgewebe, eine komplett regenerierte Gelenkknorpeloberfläche würde 0 Punkte erzielen. Eine verbesserte Knorpelreparatur zeigt sich daher in einem niedrigen Wert.

In keiner Gruppe wurde eine komplette Defektregeneration erreicht. *La-cZ*-Konstrukte führten zu einer inkompletten Defektauffüllung (■ **Abb. 7b**). Defekte mit IGF-I-Konstrukten waren bis zur Ebene des umliegenden normalen Gelenkknorpels mit neuem Gewebe aufgefüllt (■ **Abb. 7d**). Ebenso war die Integration des neuen Gewebes in den angrenzenden normalen Gelenkknorpel, die Zellmorphologie und Architektur signifikant in den IGF-I-behandelten Defekten verbessert. Die Gesamtbewertung 28 Wochen nach Transplantation war signifikant besser für die Defekte, die IGF-I-Konstrukte enthielten, als für Defekte, die *la-cZ*-Konstrukte enthielten (jeweils 13,9 und 17,1 Punkte,  $p < 0,001$ ) (■ **Abb. 7e**; [11]). Damit verbessern durch Tissue-Engineering gezüchtete Knorpelkonstrukte, die auf Chondrozyten basieren, welche den Wachstumsfaktor IGF-I überexprimieren, die Reparatur von osteochondralen Knorpeldefekten in vivo.

## Diskussion

Für eine dauerhafte Haltbarkeit des Gelenkknorpels ist die authentische Zusammensetzung und Architektur der im Reparaturgewebe gebildeten neuen extrazellulären Matrix entscheidend. Daher erscheint es erforderlich, bei weiteren Studien zur Knorpelreparatur nicht nur die Typ-I- und -II-Kollagene, sondern auch Kollagen VI, XI und IX, Proteoglykane wie Decorin, Biglykan, Chondroadherin sowie Glykoproteine wie das „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP) und Matriline zu untersuchen. Polarisations- und elektronenmikroskopische Analysen können die strukturellen Untersuchungen vervollständigen.

Die Daten dieser Studien zeigen, dass Tissue-Engineering in Verbindung mit der Überexpression von IGF-I den im Bioreaktor stattfindenden Prozess der Chondrogenese von Neoknorpel sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene moduliert. Die Daten zeigen wei-

terhin, dass durch Implantation solcher IGF-I-Konstrukte die Reparatur von osteochondralen Defekten in vivo verbessert wird. Die Ergebnisse zum Effekt der Überexpression von IGF-I auf die Chondrogenese im Bioreaktor und im Knorpeldefektmodell stimmen mit Untersuchungen in Zellkulturmodellen überein [49, 78, 79, 80]. IGF-I ist mitogen und stimuliert zugleich die Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, insbesondere von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen.

Verschiedene Studien am Tiermodell haben bereits das Potenzial von IGF-I (als Protein) demonstriert, die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten zu stimulieren [17, 56]. Hunziker und Rosenberg verbesserten so durch Applikation von 50 ng/ml IGF-I-Protein die Zellularität des Reparaturgewebes in einem chondralen Defektmodell [32]. Ebenfalls in einem chondralen Modell bei Ratten führte die Transplantation von IGF-I-transduzierten perichondralen Zellen zur Verbesserung der frühen Reparatur dieser teilschichtigen Defekte [24]. In vergleichbarer Weise konnte die Reparatur von großen osteochondralen Defekten in einem Pferdmodell durch Gabe der relativ großen Menge von 25 µg IGF-I pro Defekt sowohl ohne [56] als auch mit zusätzlicher Transplantation von Chondrozyten verbessert werden [17].

Worin liegt der Unterschied zwischen diesen Arbeiten? In all diesen Studien erfolgte die Applikation des IGF-I-Proteins oder der modifizierten Zellen mittels eines Fibringerinnsels, ohne vorherige Kultivierung dieser Zell-Fibrin-IGF-I-Komposite in einem Bioreaktor. Wir verwendeten in einem anderen Ansatz ebenfalls IGF-I-modifizierte Zellen, die vor Transplantation in ein Alginat-Hydrogel verkapselt wurden und ohne vorheriges Tissue-Engineering in Knorpeldefekte implantiert wurden [46]. Die in dieser Arbeit beschriebene Strategie berücksichtigt eine räumlich und zeitlich kontrollierte Abgabe des therapeutischen Faktors IGF-I während des Prozesses des Tissue-Engineering. Nach Transplantation der Neoknorpelkonstrukte in die osteochondralen Defekte wirkt das sezernierte IGF-I sowohl auf die Chondrozyten im Konstrukt als auch die aus dem Knochenmark aufsteigenden Zellen inner-

halb des Reparaturgewebes, die sich der Chondrogenese unterziehen. Ein stimulierender Effekt von IGF-I auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen wurde unlängst bewiesen [24, 89]. Es ist jedoch möglich, dass auch andere, von den transplantierten Chondrozyten sezernierte Faktoren diesen Prozess über autokrine und/oder parakrine Effekte stimulieren.

Aus durch Tissue-Engineering gezüchtetem Knorpel und einem als subchondrale Unterstützung dienenden knöchernen Gewebe sind auch biphasische Strukturen konstruierbar [68]. Die Transplantation dieser Knorpel-Knochen-Strukturen in osteochondrale Defekte ergab strukturelle Verbesserungen im Reparaturgewebe. Das Biomaterial, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde, war diesem ähnlich und ermöglicht eine kontrollierte Chondrogenese [18]. Beim Vergleich von dieser mit anderen Studien, in denen ein ähnliches abbaubares Gerüstwerk verwendet wurde [19, 20] ist es wichtig, die relativ stringenten Kulturbedingungen zu berücksichtigen, welche eingesetzt wurden, um den Effekt der IGF-I-Überexpression auf die Chondrogenese ohne Interaktion mit anderen Faktoren zu untersuchen. Die zellbesiedelten Trägersubstanzen wurden im Bioreaktor allein in basalem Medium ohne Hinzufügung von fetalem Kälberserum (FBS) kultiviert. Es wäre daher interessant zu testen, ob durch zusätzliche Applikation von FBS oder anderen Faktoren [28] die Zellproliferation und Matrixsynthese weiter gesteigert werden kann.

Welchen Einfluss haben mögliche Unterschiede in der Natur und der Resorptionsfähigkeit dieser bioresorbierbaren Konstrukte auf die Gelenkknorpelreparatur? Bislang wurden unterstützende Biomaterialien zur Transplantation hauptsächlich mit der Idee verwendet, die modifizierten Zellen im Defekt zu halten. Hierfür fanden Alginat [44], Agarose [62], Fibrin- oder Typ-I-Kollagengele ohne [60] oder mit Periostlappen [90] sowie die oben beschriebenen synthetischen und biologisch abbaubaren Gerüstwerke [68] Verwendung. Besonders solche Trägersubstanzen, die bereits klinisch im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation verwendet werden (wie

z. B. Typ-I-Kollagen-Membranen) [3, 39], sollten in diesem Kontext weiter evaluiert werden.

Man könnte argumentieren, dass die Knorpelreparatur im Kaninchenmodell spontan komplett abläuft und Unterschiede zu der beim Menschen aufweist. Obwohl dies für die Frage der makroskopisch sichtbaren Auffüllung des Defektes mit einem in der Farbe dem Knorpel ähnlichen Reparaturgewebe zutreffen mag, gilt es sicherlich nicht für die detaillierte mikroskopische Auswertung des Reparaturgewebes mittels eines Bewertungssystems, wie sie in diesen und anderen Studien angewandt wurde. Die fehlende Regeneration des originalen hyalinen Gelenkknorpels in der *lacZ*-Kontrollgruppe nach 28 Wochen postoperativ bestätigt die Beobachtung, dass selbst bei jugendlichen Kaninchen, die zum Abschluss der Experimente erwachsen waren, keine komplette Knorpelregeneration auftritt. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die im Kaninchenmodell zwar ebenfalls Reparatur, aber keine Knorpelregeneration fanden [4, 13, 21, 31, 32, 35, 46, 71, 72, 73]. Somit ist das angewandte Modellsystem eines zylindrischen osteochondralen Defektes gültig, um Knorpelreparaturprozesse zu untersuchen [31, 65].

Wie beteiligen sich die transplantierten Zellen an der Knorpelreparatur? Diese Frage bleibt schwierig zu beantworten und ist Grundlage für Spekulationen. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass transplantierte, allogene gezüchtete Knorpelkonstrukte nicht immunogen sind und ihre Komponentenzellen im Reparaturgewebe für 9 Monate nachweisbar waren [69]. Die dargestellte Studie ermittelte nicht, ob der im Defekt nach 6 Monaten gebildete Reparaturknorpel aus den allogenen Chondrozyten des Implantats, von aus dem Knochenmark stammenden körpereigenen Zellen oder aus beiden Quellen stammt. Es ist wahrscheinlich, dass Zellen vom Knochenmark ebenfalls zur Chondrogenese im osteochondralen Defekt beitragen. Es ist ebenfalls möglich, dass der implantierte, gezüchtete Knorpel komplett integriert wurde. Gleichfalls könnten die präformierten knorpeligen Konstrukte als eine Vorlage dienen, die im Zeitverlauf resorbiert und durch Wirtszellen ersetzt

wird. Sicherlich kommt den transplantierten Zellen die zusätzliche Rolle der Sekretion von anderen Faktoren zu, welche zusätzlich den Reparaturprozess stimulieren (■ **Abb. 8**). Weitere Arbeiten in dieser Richtung sind erforderlich, um diese Frage endgültig zu klären. In diesem Zusammenhang erscheint es ebenfalls notwendig, auch die Eignung von mesenchymalen Vorläuferzellen [63, 77, 88] als Komponentenzellen für das Tissue-Engineering von gentherapeutisch modifiziertem Knorpel zu überprüfen.

### Reparaturprinzip

Das Prinzip der Reparaturvorgänge nach Transplantation von genetisch modifizierten, durch Tissue-Engineering hergestellten Neoknorpel ist in ■ **Abb. 8** dargestellt. Die Defektbesiedlung geschieht durch die Chondrozyten im Neoknorpel. Die transfizierten Zellen sezernieren neben dem überexprimierten Gen auch andere, chondrozytenspezifische Faktoren, welche auto- oder parakrin auf die benachbarten Zellen sowie den umgebenen Gelenkknorpel wirken. Zugleich ist die Auffüllung von verbliebenen Hohlräumen durch aus dem Knochenmark aufsteigende Zellen denkbar. Eine Einwanderung von Synovialzellen ist ebenfalls möglich.

Studien mit Markergenen haben gezeigt, dass durch Ex-vivo-Strategien exprimierte Transgene in osteochondralen Knorpeldefekten für etwa einen Monat aktiv bleiben [13]. Das ist ein relativ langer Zeitraum, verglichen mit der Anwendung von rekombinanten Proteinen. Humanes BMP-2, als Protein mit Hilfe eines Kollagenschwamms in einen Defekt eingebracht, ist nur etwa eine Woche aktiv [72]. Klinische Daten lassen vermuten, dass das Reparaturgewebe in den Gelenkknorpeldefekten von Patienten über Monate bis über einige Jahren hinweg ausreift [38]. Somit ist es sinnvoll, nach Möglichkeiten zu suchen, um die Dauer der Transgenexpression weiter zu verlängern.

Wichtig erscheint, darauf hinzuweisen, dass überexprimiertes IGF-I nicht nur die Knorpelreparatur verbesserte, sondern auch die Neubildung des subchondralen Knochens stimulierte. Dies stimmt mit bereits publizierten Ergebnissen zum Ef-

fekt von IGF-I-Protein auf die Neuformation von Knochen und eine reduzierte Knochenresorption überein [54]. Die Verbesserung der Integrationskapazität ist ein wichtiger Faktor, der die Haltbarkeit der Gelenkknorpelreparatur beeinflusst. Üblicherweise verfällt die Grenzfläche im Zeitverlauf [51, 52, 73].

Kürzlich wurde in einer Pilotstudie demonstriert, dass auch mit einem baculoviralen Vektor transduzierte Chondrozyten in einem rotierenden Bioreaktor kultiviert werden können und dass die Transduktion eines Markergenes ohne negative Einflüsse auf die Chondrogenese ist [10]. Jedoch fanden keine therapeutischen Gene Anwendung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals die Möglichkeit einer auf Gentransfer und Tissue-Engineering basierenden molekularen Therapie von Knorpeldefekten. Zusätzliche Studien mit anderen potenziell therapeutischen Genen müssen daher folgen, um deren Effekte zu evaluieren.

### Ausblick

Zusammenfassend weisen unsere Daten auf den Wert von durch Tissue-Engineering gezüchteten Knorpelkonstrukten mit Überexpression von Wachstumsfaktor IGF-I für die Reparatur osteochondraler Defekte hin. Daraus ergeben sich viele interessante neue Fragen: Wird sich diese Strategie zu einem klinischen Verfahren etablieren? Hier besteht die beachtliche technische Herausforderung darin, die notwendigen Bestandteile (Zellen, Gene, bioresorbierbare Gerüstwerke, biologische Fixierung) in einen passenden Komplex zu vereinen. Wie kann die Transgenexpression in vivo verlängert werden und hat das zur Transplantation verwendete Biomaterial [66, 74] darauf einen Einfluss? Wird die Transplantation von genetisch modifizierten Zellen oder das direkte Einbringen von Genvektoren in einen Defekt zu besseren Ergebnissen führen als das hier beschriebene gentherapeutisch verbesserte Tissue-Engineering? Welcher Zelltyp ist ideal für Ex-vivo-Ansätze? Diese Fragen müssen in weiteren Studien kritisch geklärt werden.

Vordringlich ist ebenfalls, neue, bislang unbekannte therapeutische Faktoren zu identifizieren und bereits bekannte Kan-

didaten auf ihre Eignung zu prüfen, den Prozess der Chondrogenese im Defekt zu verbessern. An diese Arbeiten anknüpfende Studien in Großtiermodellen müssen über die biomechanischen Eigenschaften des Reparaturgewebes Auskunft geben. Im Hinblick auf eine klinische Situation ist es entscheidend, die Beobachtungsperioden zu verlängern, um die Langzeiteigenschaften der jeweiligen Reparaturgewebe zu beurteilen und mit etablierten Verfahren der Knorpelreparatur zu vergleichen. Weiterführende Studien sind daher indiziert, um das volle Potenzial der Modulation des Tissue-Engineering von Knorpel durch den Transfer therapeutischer Gene zu evaluieren.

## Fazit

**Unsere Daten zeigen: Durch Tissue-Engineering gezüchtete Knorpelkonstrukte, die auf Chondrozyten basieren, welche den Wachstumsfaktor IGF-I überexprimieren, verbessern die Reparatur von osteochondralen Defekten in vivo.**

## Korrespondierender Autor

**PD Dr. Henning Madry**

Labor für Experimentelle Orthopädie, Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes 66421 Homburg  
hmad@hotmail.com

**Danksagung.** Unterstützt durch die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (BMBF-LPD 9801–10), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG MA 2363/1–1, /1–2, /1–3 und CU 55/1–1, /1–2, /1–3), und die Deutsche Arthrose-Hilfe.

**Interessenkonflikt.** Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

## Literatur

- Adachi N, Sato K, Usas A et al. (2002) Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 29: 1920–1930
- Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L et al. (1997) Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 5: 275–282

- Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR et al. (2005) Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Br* 87: 640–645
- Bentley G, Greer RB 3rd (1971) Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 230: 385–388
- Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S (1999) Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 5: 753–759
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895
- Brower-Toland BD, Saxer RA, Goodrich LR et al. (2001) Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. *Hum Gene Ther* 12: 117–129
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47: 487–504
- Bulstra SK, Homminga GN, Buurman WA et al. (1990) The potential of adult human perichondrium to form hyaline cartilage in vitro. *J Orthop Res* 8: 328–335
- Chen HC, Lee HP, Ho YC et al. (2006) Combination of baculovirus-mediated gene transfer and rotating-shaft bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3154–3162
- Cucchiari M, Kaul G, Zurakowski D et al. (2004) Gene transfer of human IGF-I in cartilaginous tissue engineered constructs amplifies the repair of full-thickness articular cartilage defects in vivo. (Abstract). *Trans Orthop Res Soc* 50: 0699
- Cucchiari M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7: 1495–1509
- Cucchiari M, Madry H, Ma C et al. (2005) Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* 12: 229–238
- Cucchiari M, Thurn T, Weimer A et al. (2007) Restoration of extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor sox9. *Arthritis Rheum* 56(1): 158–167
- Dinser R, Kreppel F, Zaucke F et al. (2001) Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 116: 69–77
- Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P et al. (2000) Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 379 (Suppl): S214–S219
- Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ (2002) Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 84: 276–288
- Freed LE, Grande DA, Lingbin Z et al. (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28: 891–899
- Freed LE, Hollander AP, Martin I et al. (1998) Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240: 58–65
- Freed LE, Langer R, Martin I et al. (1997) Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13885–13890
- Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62: 79–89
- Garcia AM, Szasz N, Trippel SB et al. (2003) Transport and binding of insulin-like growth factor I through articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 415: 69–79
- Geiger F, Bertram H, Berger I et al. (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20: 2028–2035
- Gelse K, Mark K von der, Aigner T et al. (2003) Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 48: 430–441
- Gies T (1883) Ueber Heilung von Knorpelwunden. *Dtsch Z Chir* 18: 8–34
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF et al. (1994) Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94: 2307–2316
- Grande DA, Mason J, Light E, Dines D (2003) Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am (Suppl 2)* 85-A: 111–116
- Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J et al. (2004) Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 559–567
- Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT et al. (2003) Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 21: 573–83
- Hirschmann F, Verhoeyen E, Wirth D et al. (2002) Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 109–118
- Hunziker EB (1999) Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res* 367 (Suppl): S135–S146
- Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78: 721–733
- Kang R, Marui T, Ghivizzani SC et al. (1997) Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage* 5: 139–143
- Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N et al. (2004) Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDM1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43: 980–985
- Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D et al. (2006) Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med* 8: 100–111
- Kawebelum M, Aguilar MC, Blancas E et al. (1994) Histological and radiographic determination of the age of physal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res* 12: 747–749
- Kennedy J, Baris C, Hoyland JA et al. (1999) Immunofluorescent localization of estrogen receptor-alpha in growth plates of rabbits, but not in rats, at sexual maturity. *Bone* 24: 9–16
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC et al. (2004) Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 455–464
- Krishnan SP, Skinner JA, Carrington RW et al. (2006) Collagen-covered autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans of the knee: two- to seven-year results. *J Bone Joint Surg Br* 88: 203–205
- Kuroda R, Usas A, Kubo S et al. (2006) Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 54: 433–442
- Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920–926
- Lu Valle P, Iwamoto M, Fanning P et al. (1993) Multiple negative elements in a gene that codes for an extracellular matrix protein, collagen X, restrict expression to hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 121: 1173–1179
- Madry H (2004) Arthrose: Operative und rekonstruktive Behandlung. In: Kohn D, (Hrsg) *Das Knie*. Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 367–379



44. Madry H, Cucchiari M, Stein U et al. (2003) Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med* 5: 502–509
45. Madry H, Cucchiari M, Terwilliger EF, Trippel SB (2003) Efficient and persistent gene transfer into articular cartilage using recombinant adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Human Gene Ther* 14: 393–402
46. Madry H, Kaul G, Cucchiari M et al. (2005) Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 12: 1171–1179
47. Madry H, Padera B, Seidel J et al. (2002) Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther* 13: 1621–1630
48. Madry H, Trippel SB (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 7: 286–291
49. Madry H, Zurakowski D, Trippel SB (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 8: 1443–1449
50. Mankin HJ (1994) Chondrocyte transplantation—one answer to an old question. *N Engl J Med* 331: 940–941
51. Mankin HJ (1974) The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *N Engl J Med* 291: 1285–1292
52. Mankin HJ (1974) The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts). *N Engl J Med* 291: 1335–1340
53. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M et al. (2000) Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 379 (Suppl): S171–S178
54. Meinel L, Zoidis E, Zapf J et al. (2003) Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone* 33: 660–672
55. Müller B, Kohn D (1999) Indikation und Durchführung der Knapel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Orthopäde* 28: 4–10
56. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H (1999) Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 17: 475–87
57. O'Driscoll SW, Salter RB (1984) The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Am]* 66: 1248–1257
58. Park J, Gelse K, Frank S et al. (2006) Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med* 8: 112–125
59. Pascher A, Palmer GD, Steinert A et al. (2004) Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* 11: 133–141
60. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K (2000) The influence of transforming growth factor beta1 on mesenchymal cell repair of full-thickness cartilage defects. *J Biomed Mater Res* 52: 543–552
61. Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *Proceedings of the British Orthopaedic Association. J Bone Joint Surg (Br)* 41: 618
62. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F et al. (1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 50–65
63. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M (2002) Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 89: 338–351
64. Rogachevsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD (1993) Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 1: 105–114
65. Rudert M (2002) Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs* 171: 229–240
66. Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth CJ (2005) Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. *Arch Orthop Trauma Surg* 125: 598–608
67. Saltzman WM (1999) Delivering tissue regeneration. *Nat Biotechnol* 17: 534–535
68. Schaefer D, Martin I, Jundt G et al. (2002) Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum* 46: 2524–2534
69. Schreiber RE, Ilten-Kirby BM, Dunkelman NS et al. (1999) Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants. *Clin Orthop Relat Res* 367 (Suppl): S382–S395
70. Seggel R (1904) Experimentelle Beiträge zur Anatomie und Pathologie des Gelenknorpels. *Studien über Knapelwunden und Defekte. Dsch Z Chir* 21: 453–466
71. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79: 1452–1463
72. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS et al. (2000) Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 82: 151–160
73. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75: 532–553
74. Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV (2004) Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 15: 411–418
75. Smith P, Shuler FD, Georgescu HI, Ghivizzani SC, Johnstone B, Niyibizi C, Robbins PD, Evans CH (2000) Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum* 43: 1156–1164
76. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knapeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28: 26–32
77. Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U, Hendrich C (2003) Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 21: 1090–1097
78. Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43: 129–132
79. Trippel SB, Corvol MT, Dumontier MF et al. (1989) Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res* 25: 76–82
80. Trippel SB, Van Wyk JJ, Foster MB, Svoboda ME (1983) Characterization of a specific somatomedin-c receptor on isolated bovine growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 112: 2128–2136
81. Ueblicher P, Wagner B, Kruger A et al. (2004) Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 711–719
82. Ullrich A, Berman CH, Dull TJ et al. (1984) Isolation of the human insulin-like growth factor I gene using a single synthetic DNA probe. *Embo J* 3: 361–364
83. Ulrich-Vinther M, Duch MR, Soballe K et al. (2004) In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector. *J Orthop Res* 22: 726–734
84. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Goater JJ et al. (2002) Light-activated gene transduction enhances adeno-associated virus vector-mediated gene expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 46: 2095–2104
85. Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B et al. (1999) Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res* 17: 130–138
86. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I et al. (1998) Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 14: 193–202
87. Wei X, Messner K (1999) Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res* 46: 539–548
88. Winter A, Breit S, Parsch D et al. (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418–429
89. Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA et al. (2001) Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 19: 738–749
90. Yokoo N, Saito T, Uesugi M et al. (2005) Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52: 164–170